

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 476—478

Lactat-Bestimmung mit 3-Acetyl-pyridin-adenin-dinucleotid (APAD)

Von C. MAURER und BRUNHILDE POPPENDIEK

Aus dem Klinisch-Chemischen Laboratorium (Leiter: Priv. Doz. Dr. C. Maurer) der Chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 6. Mai/8. September 1973)

Die enzymatische Lactat-Bestimmung mit NAD und Hydrazin als Ketonfänger erfordert mit Vorbereitungstechnik mehr als eine Stunde. Für die Überwachung von Patienten im Schock kommen die Ergebnisse daher zu spät. Durch die günstigere Lage des Reaktionsgleichgewichtes bei Verwendung von APAD als Wasserstoff-Akzeptor ist ein quantitativer Umsatz von Lactat innerhalb weniger Minuten möglich. Präzision und Übereinstimmung mit erwarteten Werten sind befriedigend. Die größere Streuung der Werte aus Kapillarblut ist der Entnahmetechnik zuzuschreiben. NAD/Hydrazin- und APAD-Methode geben nahezu übereinstimmende Ergebnisse.

Lactate determination with acetylpyridine adenine dinucleotide (APAD)

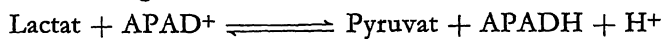
The enzymatic determination of lactate with NAD, using hydrazine for trapping the pyruvate requires more than one hour with preparation time. Thus the results are not available in time for the supervision of patients in shock. By using APAD as the hydrogen receptor a more favourable equilibrium can be reached and it is possible to acquire a quantitative turnover of lactate within a few minutes. Precision and correlation with expected results are satisfactory. The wide scatter of results for capillary blood is caused by the sampling method; otherwise, the NAD/Hydrazine- and the APAD-method give almost identical results.

Die Lactat-Bestimmung mit NAD und Hydrazin erfordert nahezu eine Stunde.

Für die Überwachung von Patienten im Schock wird die Untersuchung damit häufig wertlos, weil die Ergebnisse zu spät verfügbar sind, um als Leitlinien für die Therapie eine Hilfe zu sein.

Prinzip

Das Gleichgewicht der Reaktion



liegt mit einer Gleichgewichtskonstanten $K = 5,65 \cdot 10^{-10}$ um den Faktor $2,25 \cdot 10^2$ günstiger als das des Systems NAD^+/NADH (1).

Es gelingt daher durch hohe Konzentrationen an APAD ($> 1 \text{ mmol/l}$) Lactat nahezu quantitativ und innerhalb von 5–10 min umzusetzen.

Der molare Extinktionskoeffizient von APAD

$$\epsilon_{(365,366 \text{ nm})} = 9,1 \cdot 10^6 \text{ (cm}^2/\text{mol)}.$$

Material und Methoden

Reagenzien

1. Glycinpuffer 1 mol/l pH 9,4.
75 g Glycin p. a. und 2 g EDTA-Dinatriumsalz werden in etwa 500 ml Wasser gelöst und mit Natronlauge 1 mol/l auf pH 9,4 eingestellt und bis zur Marke aufgefüllt.
2. 3-Acetyl-pyridin-analogon des NAD (APAD) 50 mmol/l (Boehringer, Mannheim).
3. Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Kaninchenmuskeln.
Enzymsuspension in Ammoniumsulfat (5 mg/ml) (Boehringer, Mannheim).
4. Kaliumhydrogencarbonat 2 mol/l.
20 g Kaliumhydrogencarbonat p. a. werden in 100 ml Wasser gelöst.
5. Trichloressigsäure 100 g/l.

Haltbarkeit der Lösungen

Der Glycinpuffer ist bei $+4^\circ\text{C}$ maximal 8 Tage haltbar. Es empfiehlt sich, kleinere Portionen bei -25°C zu halten und bei Bedarf aufzutauen.

Das APAD ist in gelöstem Zustand nur wenige Tage haltbar.

Arbeitsweise

Für Kapillarblutuntersuchungen wurde die Methode im Mikrolitermaßstab ausgearbeitet. Ein weiterer Grund ist der hohe Preis für APAD.

Probenahme und Probenvorbereitung

0,1 ml Trichloressigsäure werden in Mikrozentrifugenröhrchen (0,4 ml Inhalt) vorgelegt und im Eisbad gekühlt. 0,02 ml Blut werden mit graduerten Kapillaren entnommen und in die Trichloressigsäure ausgeblasen. Gut mischen und zentrifugieren.

Bestimmungsansatz

Schichtdicke 1 cm. Meßvolumen 1,17 ml. Messung gegen Luft. Meßwellenlänge 365 oder 366 nm.

	Leerwert	Probe	Konzentration im Test
Probe (Überstand nach Entweißung)	—	0,05 ml	
Wasser/Trichloressigsäure im Verhältnis 1:6	0,05 ml	—	
Kaliumhydrogencarbonat zur Neutralisation	0,05 ml	0,05 ml	
Glycinpuffer	1,00 ml	1,00 ml	0,85 mol/l
LDH-Suspension	0,02 ml	0,02 ml	85 µg/ml
Gut mischen. Wenn Extinktion konstant, E_1 von Leerwert und Probenansatz messen.			
APAD	0,05 ml	0,05 ml	2,15 mmol/l

Nach Stillstand der Reaktion E_2 von Leerwert und Probenansatz messen.

Berechnung

L-Lactat wird quantitativ umgesetzt. Die Lactatkonzentration der Probe läßt sich daher aus der gegen Luft gemessenen Extinktionsdifferenz

$$E_2 - E_1 = \Delta E_{(\text{Probe})} - \Delta E_{(\text{Leerwert})}$$

berechnen.

Unter Berücksichtigung der Probenverdünnung durch Ent-eiweißung, Neutralisation und Reaktionsansatz ergibt sich ein Umrechnungsfaktor $F = 13,08$. Für eiweißfreie Standardlösungen oder lyophilisierte Kontrollseren beträgt $F = 15,43$.

Ergebnisse

Die mit dieser Methode ermittelten Lactatkonzentrationen im Venenblut zeigen eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Resultaten (2, 3, 4). So zeigten 13 bettlägerige Patienten (Gruppe A) mit unkomplizierten Knochenfrakturen einen Mittelwert $\bar{x} = 0,748$ mmol/l (0,30–1,11 mmol/l). 10 gesunde Testpersonen (Gruppe B) wiesen bei geringer körperlicher Belastung einen Mittelwert $\bar{x} = 0,753$ mmol/l auf (0,26–1,55 mmol/l). Dagegen zeigten die Kapillarblutproben durchwegs höhere Konzentrationen und eine größere Streuung. Bei der Gruppe A betrug der Mittelwert $\bar{x} = 1,505$ mmol/l (0,52–3,07). Bei der Gruppe B der Mittelwert $\bar{x} = 1,731$ mmol/l (0,43–2,56).

Präzision in der Serie

Venenblut. $n = 10$.

$\bar{x} = 0,918$ mmol/l. $s = 0,044$ mmol/l.

$\bar{x} \pm 2s = 0,830 - 1,00$ mmol/l.

Richtigkeitskontrolle

Lyophilisiertes Kontrollserum (Versatol Acidosis).
 $n = 12$. Sollwert 6,56 mmol/l.

Ist: 6,26 – 6,45 – 6,72 – 7,11 – 6,33 – 6,63 – 6,54 – 5,97 – 6,34 – 6,36 – 6,45 – 6,34 mmol/l.

$\bar{x} = 6,47$ mmol/l.

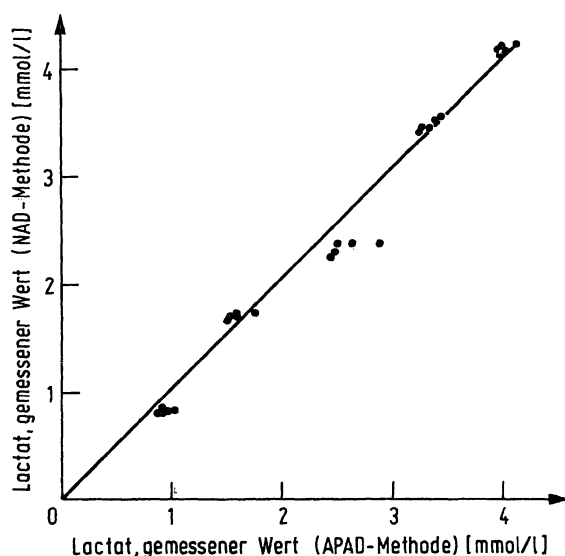


Abb. 1

Korrelation der Lactat-Konzentrationen gemessen mit NAD (Ordinate) und APAD (Abzisse) als Redoxsystem

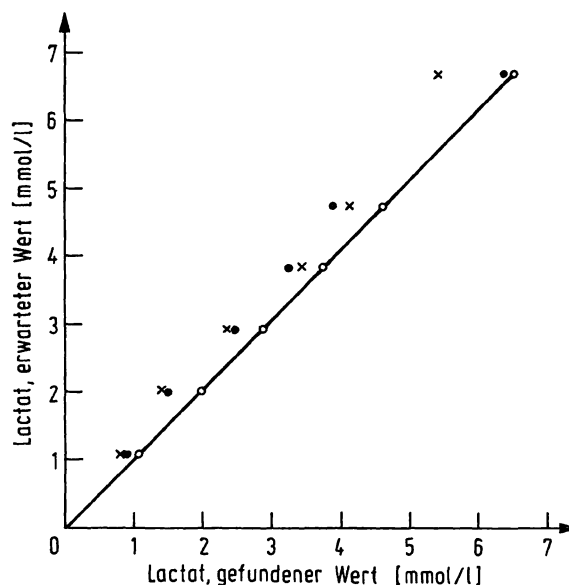


Abb. 2

Korrelation zwischen den erwarteten Lactat-Werten (o—o—o) und den Ergebnissen der APAD-Methode (Punkte) und NAD-Methode (Kreuze). Jeweils Mittelwerte aus 5 Bestimmungen

Lyophilisiertes Kontrollserum (Versatol Alkalosis).

$n = 10$. Sollwert 2,90 mmol/l.

Ist: 2,41 – 2,47 – 2,45 – 2,61 – 2,52 – 2,53 – 2,48 – 2,43 – 2,61 – 2,48 mmol/l.

$\bar{x} = 2,54$ mmol/l.

Weiter wurde die Korrelation der beschriebenen Methode mit der von RICHTERICH und HOHORST angegebenen Methode (3, 5) mit NAD und Zusatz von Hydrazin als Ketonfänger verglichen (Abb. 1). Der Korrelationskoeffizient $r = 0,992$. Die Abbildung 2 zeigt die Abweichung von den erwarteten Werten für die APAD-Methode ($r = 0,961$) und die NAD/Hydrazin-Methode ($r = 0,946$).

Diskussion**Störungen**

1. Rasche Blutentnahme und sofortige Enteiweißung sind erforderlich, da es innerhalb kurzer Zeit zu einem Anstieg der Lactat-Konzentrationen durch Reduktion von Pyruvat kommt. Bei Entnahme von 0,02 ml in heparinisierten Kapillaren ist dies aber auch bei peripherer Mangel durchblutung möglich.

2. Die Reagenzien müssen stets frisch zubereitet oder kurzfristig aufgetaut werden (s. Haltbarkeit der Reagenzien). Die Denaturierung durch Lagerungseinflüsse führt zu falsch niedrigen Resultaten. Daher empfiehlt es sich, einen wäßrigen Standard zur Kontrolle mitzuführen. Auch diese Standardlösung muß in Aliquots tiefgefroren aufbewahrt und für jeden Versuch aufgetaut werden.

3. Bei Verwendung frischer Reagenzien ist die Anfangs-Extinktion E_1 immer konstant. Dagegen kommt die Reduktion von APAD nicht zum Stillstand. Nach Ablauf von 5–7 min ist jedoch die Extinktionsänderung $\Delta E/\Delta t$ bei Leerwert und Proben gleich und liegt unter

0,005/min, so daß die Zeitdifferenzen bei der Ablesung keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben.

Verwendung der Methode

L-Lactat ist als Gradmesser einer peripheren Hypoxidose eine wichtige Kenngröße für die Prognose und Therapie von Schockzuständen (6).

Die üblichen Kriterien wie pH, $p\text{CO}_2$ und Basenüberschuß bzw. Standardbicarbonat geben nach Verabreichung von Pufferlösungen keine sicheren Hinweise für die metabolische Situation in der Körperperipherie. Sauerstoffpartialdruck und Sauerstoffsättigung sind bei einer schockbedingten Mikrozirkulationsstörung mit Verlegung der Endstrombahn unsichere Kriterien. Die Sauerstoffkonzentration im Kapillarblut ist wegen der wechselnden Mischungsverhältnisse von geringem Wert. Hier vermag die vergleichende Bestimmung der

Lactat-Konzentrationen im venösen oder arteriellen und dem Kapillarblut Hinweise auf eine fortbestehende metabolische Acidose und Hypoxie zu geben.

Rasche Änderungen der metabolischen Situation, nicht zuletzt durch therapeutische Maßnahmen bedingt, ergeben eine nur kurzfristige Relevanz der Laborresultate. Wenn das Ergebnis einer Lactat-Bestimmung nicht früher als nach einer Stunde verfügbar wird, kann das Resultat allenfalls noch für eine retrospektive Beurteilung, nicht aber als Richtlinie für therapeutische Maßnahmen dienen. Die Bestimmung muß auch unter den Bedingungen des Bereitschaftsdienstes gesehen werden, welche die Durchführung von zeitraubenden Bestimmungen nicht zulassen.

Die beschriebene Methode kann das Ergebnis einschließlich Probenahme, Vorbereitung und Durchführung der Bestimmung innerhalb von 15 min liefern.

Literatur

1. HOLZER, H. & SÖLING, H. D. (1962), *Biochem. Z.* 336, 201—214.
2. HUCKABEE, W. (1958), *J. Clin. Invest.* 37, 244—254. — 3. RICHTERICH, R. (1971), *Klinische Chemie. Theorie und Praxis*, 3. Aufl. S. 256—258, Karger, Basel. — 4. LAUDAHN, G. (1959), *Klin. Wochenschr.* 37, 850—858. — 5. HOHORST, H. J. (1970), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (BERGMEYER, H. U. Hrsg.) 2. Aufl., Bd. 2, 1425—1429, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. — 6. LASCH, H. G. (1970), in *Auftrag der Klinik an das klinisch-chemische Laboratorium* (LANG, H., RICK, W., Hrsg.), 157—162, Schattauer, Stuttgart.

Priv. Doz. Dr. C. Maurer
69 Heidelberg
Kirschnerstr. 1